

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861403

研究課題名(和文) 神経障害痛モデルでの不安・うつ症状と記憶・学習能力に対するポリフェノールの影響

研究課題名(英文) The effects of polyphenols on anxiety, depression, memory and learning in neuropathic pain models.

研究代表者

寺田 忠徳 (TERADA, Tadanori)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：10399206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：2種類のラット神経障害性疼痛モデル(坐骨神経絞扼と糖尿病性ニューロパシー)で3種類のポリフェノール(クロロゲン酸、ルテオリン、クルクミン)を髄腔内と脳室内に投与し不安、抑うつ症状、運動・学習能力に対する影響を調べた。両方のモデルにおいて全てのポリフェノールは脊髄と脳で抗不安作用や抗うつ作用を持つことが示唆された。一方、高用量では運動機能を抑制することが分かった。抗侵害作用に加えこれらの結果からポリフェノールには神経障害性疼痛に対する新しい治療薬としての可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effects of natural polyphenols on anxiety, depression, and motor performance were examined in rat neuropathic pain models. In chronic constriction injury model and diabetic polyneuropathy model, representative polyphenols, chlorogenic acid, luteolin, and curcumin dose-dependently increased percent of the time spent in the central area and total moving distance in the open field test. They significantly increased time spent in the open arms in the elevated plus maze. They also increased swimming time and decreased immobility time in the forced swim test. On the other hand, they inhibited motor function at highest doses in the rotarod test. These results indicate that chlorogenic acid, luteolin, and curcumin have anxiolytic and antidepressive actions along with antihyperalgesic action in the neuropathic pain models. Natural polyphenols could be candidate therapeutic agents for neuropathic pain.

研究分野：疼痛管理学

キーワード：神経障害性疼痛 抑うつ症状 中枢作用 不安障害 学習障害

### 1. 研究開始当初の背景

神経障害痛は現在有効な治療薬が無いため臨床でその治療に難渋しており、慢性痛の大きな原因となっている。痛み自体に加え、薬物の副作用により多くの人々が日常生活や就労・就学に支障を来している。このため副作用の少ない新しい治療薬の開発が強く望まれる。一方、慢性痛は高率に不安障害や抑うつ状態を引き起こすため治療効果が著しく低下し、患者の日常生活動作(ADL)が損なわれることで痛みの悪循環に陥る。神経障害痛患者の治療には疼痛の緩和と同時に不安や抑うつ症状に対するケアや学習能力への影響を考慮することが患者のADLの向上や就学・就労の観点から重要になる。

天然植物に含まれるポリフェノールには抗酸化作用があり摂取すると動脈硬化を抑制し脳梗塞・心筋梗塞のリスクを減らすことが知られている。また、これまでにいくつかのポリフェノールには抗癌作用や抗炎症作用/抗侵害作用があることが示されている。筆者らは既に様々なタイプの疼痛モデルを用いてポリフェノールの鎮痛作用と運動機能に及ぼす作用を行動薬理的に調べてきた。その結果、髄腔内に投与されたクルクミン、クロロゲン酸、ルテオリン、レスベラトロールには急性痛や炎症性疼痛だけでなく神経障害痛に対しても鎮痛作用があることを見出している。ポリフェノールは天然の成分であるため体内摂取による副作用は合成薬物よりも少ないことが期待できる。一方、慢性痛患者に高率に現れる不安障害や抑うつ症状も患者のADLや生活の質(QOL)に大きく影響を及ぼしている。慢性痛の治療には単に鎮痛を図るだけでなく不安や抑うつ症状の改善が重要である。近年、坐骨神経絞扼による神経障害痛動物モデルで正常動物と比較して不安や抑うつ関連行動が見られることが報告されている。

### 2. 研究の目的

動物モデルを用いた神経障害痛研究は抗侵害作用に関するものがほとんどである。本研究は、不安・抑うつ症状が慢性痛患者の治療効果やその満足度、QOLに大きく影響していることに基づき、神経障害痛動物モデルを用いてポリフェノールの抗不安作用、抗うつ作用の有無を運動・学習能力への影響と併せて検討する。抗侵害作用を持つ薬物を用いてこれらの作用を調べた研究は非常に少ない。天然のポリフェノールの中に抗不安や抗うつ作用を持つものがあれば従来の薬物には無い利点を備えた新しい治療薬として臨床応用できる可能性がある。集学的アプローチが不可欠な神経障害痛治療の進展には動物実験においても多角的な評価を行っていくことが必要である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 神経障害性疼痛モデルの作製

#### 坐骨神経絞扼モデル(CCI)

Bennett and Xie の方法により、雄 Sprague-Dawley(SD)ラットをペントバルビタール麻酔下に大腿骨上の皮膚を切開し片側の坐骨神経を 4.0-silk 糸で 4 箇所緩く結紮する。処置後 4 日目から患肢に痛覚過敏、アロディニアが発現し持続する。麻酔下に坐骨神経を剥離・露出のみを行う sham operation を施し、坐骨神経損傷の影響を確認した。Ugo Basile 社製 圧刺激疼痛閾値測定装置を用いて痛覚過敏が認められたラットを用いて実験を行った。

糖尿病性ニューロパチーモデル(DM); 脾細胞を選択的に破壊するストレプトゾトシン 100mg/kg を 4 週令の雄 SD ラットに腹腔内投与する。1 週間後に血糖値が 250mg/dL 以上のラットを糖尿病ラットとする。投与後 4 週以降に高血糖が持続し、Ugo Basile 社製圧刺激疼痛閾値測定装置により生理食塩水を投与した正常ラットと比べて機械的痛覚過敏が認められたラットを実験に用いた。

#### (2) クモ膜下カテーテルおよび脳室カニューレ留置

薬物を髄腔内に投与するため、麻酔下に脳定位固定装置を用いて SD ラットの大槽から尾側に向かってポリエチレンカテーテル(PE-10)を 8.5cm 挿入した。また、脳室内投与するため、ラット右側脳室に 22G のステンレス製のガイドカニューレを頭頂骨より 4.0mm 挿入し、歯科用セメントとアンカースクリューで頭部に固定した。処置 1 週間後に 29G の注入用カニューレに PE-20 を接続し、各種薬物または生理食塩水(対照群)10  $\mu$ L をマイクロシリンジで緩徐に注入した。

結果は one-way ANOVA または two-way ANOVA で統計解析を行い、 $P < 0.05$  を有意とした。(n=6-8)

#### (3) 不安・抑うつに対する作用の検討

オープンフィールド(OF)試験(不安・抑うつの評価):ラットを高さ 40cm の壁で囲まれた 80cm 四方のオープンフィールドの中央に置き、5 分間自由に探索させる。不安が強いとフィールドの外側領域を好むため中央部分での滞在時間が短縮する。ラットの探索行動をビデオ撮影し、ビデオ行動解析システム[Stoelting 社製 ANY-maze]で解析した。中央部分に滞在した割合(%)と総移動距離(cm)を定量評価した。

高架式十字迷路(EPM)試験(不安・抑うつの評価):床から 70cm の高さにある十字型の 4 本のアームの中央にラットを置き、5 分間自由に探索させる。不安が強いラットは壁のないオープンアームの滞在時間が短縮し、壁で囲まれたクローズドアームの滞在時間が延長する。オープンアーム滞在時間とクローズドアーム滞在時間をビデオ行動解析シス

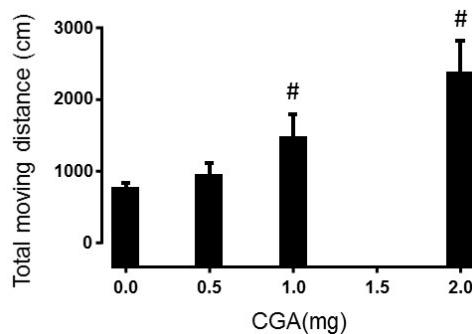
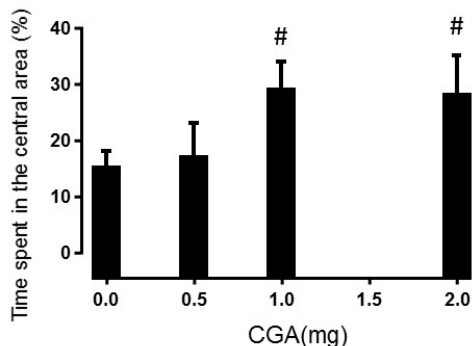
テム[Stoelting 社製 ANY-maze]で定量評価した。

強制水泳試験 (FST:抑うつの評価):ラットを逃避不可能な深さ 50cm の円柱型の水槽に入れ、強制水泳を負荷する。1 回目に 15 分間のトライアルを行い、24 時間後に行う 2 回目の 5 分間の試験で逃避行動の後に無動行動になるまでの時間(swimming time)と無動行動の持続時間(immobility time)を測定し、swimming time と immobility time の変化を抑うつ行動の指標として評価した。

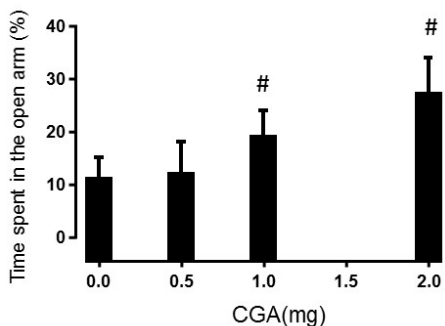
#### 4. 研究成果

(1)CCI モデルでのポリフェノール髄腔内投与による不安・抑うつ症状、運動・学習能力に与える影響

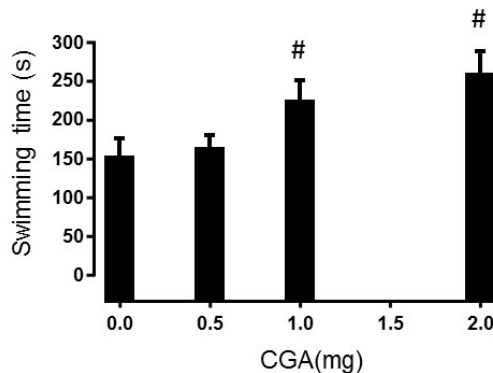
クロロゲン酸、ルテオリン、クルクミン (0.5-2.0mg/10 $\mu$ L)は用量依存性に OF 試験において 5 分間の観察期間での中央部分の滞在時間の割合(%)と総移動距離(cm)を増加させた。



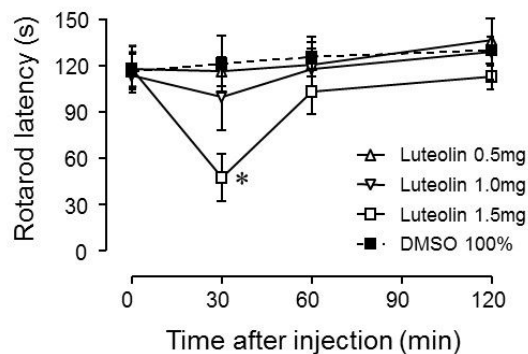
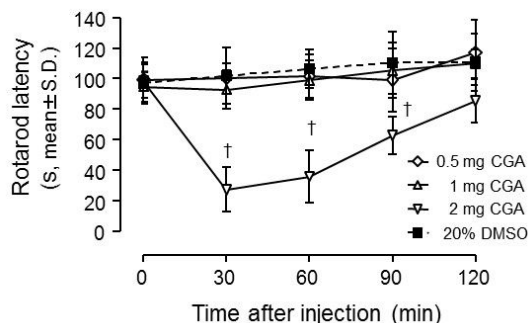
クロロゲン酸、ルテオリン、クルクミン (0.5-2.0mg/10 $\mu$ L)は用量依存性に EPM 試験において 5 分間の観察期間でのオープンアームの滞在時間の割合(%)を増加させた。



クロロゲン酸、ルテオリン、クルクミン (0.5-2.0mg/10 $\mu$ L)は用量依存性に FST において 5 分間の観察期間での swimming time を増加させ、immobility time を減少させた。



クロロゲン酸 (CGA)、ルテオリン (0.5-2.0mg/10 $\mu$ L)は高用量でのみロータロッド試験における潜時を短縮させた。



(2)CCI モデルでのポリフェノール脳室内投与による不安・抑うつ症状に与える影響

クロロゲン酸、ルテオリン、クルクミン (0.5-2.0mg/10 $\mu$ L)は用量依存性に OF 試験において 5 分間の観察期間での中央領域の滞在時間の割合(%)と総移動距離(cm)を増加させた。

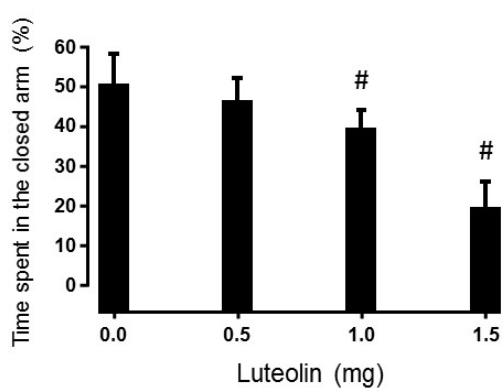
クロロゲン酸、ルテオリン、クルクミン (0.5-2.0mg/10 $\mu$ L)は用量依存性に EPM 試験において 5 分間の観察期間でのオープンアームの滞在時間の割合(%)を増加させた。

クロロゲン酸、ルテオリン、クルクミン (0.5-2.0mg/10 $\mu$ L)は用量依存性に FST において5分間の観察期間での swimming time を増加させ、immobility time を減少させた。

(3)DM モデルでのポリフェノール髄腔内投与による不安・抑うつ症状に与える影響

クロロゲン酸、ルテオリン(0.5-2.0mg/10 $\mu$ L)は用量依存性に OF 試験において5分間の観察期間での中央領域の滞在時間の割合(%)と総移動距離(cm)を増加させた。

クロロゲン酸、ルテオリン(0.5-2.0mg/10 $\mu$ L)は用量依存性に EPM 試験において5分間の観察期間でのオープンアームの滞在時間の割合(%)を増加させ、クローズドアームの滞在時間の割合(%)を減少させた。



クロロゲン酸、ルテオリン(0.5-2.0mg/10 $\mu$ L)は用量依存性に FST において5分間の観察期間での swimming time を増加させ、immobility time を減少させた。

(4)DM モデルでのポリフェノール脳室内投与による不安・抑うつ症状に与える影響

クロロゲン酸、ルテオリン(0.5-2.0mg/10 $\mu$ L)は用量依存性に OF 試験において5分間の観察期間での中央領域の滞在時間の割合(%)と総移動距離(cm)を増加させた。

クロロゲン酸、ルテオリン(0.5-2.0mg/10 $\mu$ L)は用量依存性に EPM 試験において5分間の観察期間でのオープンアームの滞在時間の割合(%)を増加させた。

クロロゲン酸、ルテオリン(0.5-2.0mg/10 $\mu$ L)は用量依存性に FST において5分間の観察期間での swimming time を増加させ、immobility time を減少させた。

以上の結果から CCI と DM の両方のモデルにおいてポリフェノールは脊髄と脳で抗不安作用や抗うつ作用を持つことが示唆された。一方、高用量では髄腔内投与により運動機能を抑制することが分かった。従来分かっている抗痛覚過敏作用に加え、本研究により、

ポリフェノールは神経障害性疼痛に随伴する抑うつ・不安障害に対して改善させる作用があることが分かった。クロロゲン酸、ルテオリン、クルクミンを含むポリフェノールには神経障害性疼痛治療薬としての可能性があることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

Takahashi Y, Hara K, Haranishi Y, Terada T, Obara G, Sata T. Antinociceptive effect of intracerebroventricular administration of glycine transporter-2 inhibitor ALX1393 in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Pharmacol Biochem Behav* 2015;130:46-52. 査読有

doi: 10.1016/j.pbb.2015.01.001.

Hara K, Haranishi Y, Terada T, Takahashi Y, Nakamura M, Sata T. Effects of intrathecal and intracerebroventricular administration of luteolin in a rat neuropathic pain model. *Pharmacol Biochem Behav* 2014;125:78-84. 査読有  
doi: 10.1016/j.pbb.2014.08.011

[学会発表](計 3件)

原 幸治、原西 保典、寺田 忠徳、ラット神経障害性疼痛モデルにおけるカンナビノイド再取り込み阻害薬 AM404 の抗痛覚過敏作用、日本麻酔科学会第63回学術集会、2016年5月27日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

原 幸治、原西 保典、寺田 忠徳、高橋 良宏、小原 剛、佐多 竹良、ラット疼痛モデルでのグリシントランスポーター2阻害薬 ALX1393 の脳室内投与による鎮痛作用、日本麻酔科学会第62回学術集会、2015年5月29日、神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

原 幸治、原西 保典、高橋 良宏、寺田 忠徳、佐多 竹良、ラット神経障害性疼痛モデルにおけるルテオリン髄腔内投与の抗痛覚過敏作用、日本麻酔科学会第61回学術集会、2014年5月16日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

寺田 忠徳 (TERADA, Tadanori)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：10399206